

# UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

## FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



### CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“EFECTO DE LA APLICACIÓN DE GnRH SINTÉTICA SOBRE LA CALIDAD SEMINAL Y CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE CARNEROS ALIMENTADOS CON ALFALFA CONTAMINADA CON *Pseudopeziza medicaginis*”

**PROYECTO FINAL DE INVESTIGACIÓN REQUISITO PARA OBTENER EL  
GRADO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**NOMBRE DEL AUTOR:**  
BRYAN SEBASTIAN BUSTOS CAZAR

**NOMBRE DEL TUTOR:**  
Ing. GONZALO ARAGADVAY YUNGÁN, Mg

**CEVALLOS-ECUADOR**  
Diciembre - 2019

**APROBACIÓN**

“EFECTO DE LA APLICACIÓN DE GnRH SINTÉTICA SOBRE LA CALIDAD SEMINAL Y CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE CARNEROS ALIMENTADOS CON ALFALFA CONTAMINADA CON *Pseudopeziza medicaginis*”

**REVISADO POR:**

.....

**Ing. Gonzalo Aragadvay Yungán, Mg**

## DERECHOS DE AUTOR

“Al presentar este Informe Final Del Proyecto De Investigación titulado ““EFECTO DE LA APLICACIÓN DE GnRH SINTÉTICA SOBRE LA CALIDAD SEMINAL Y CARACTERISTICAS REPRODUCTIVAS DE CARNEROS ALIMENTADOS CON ALFALFA CONTAMINADA CON *Pseudopeziza medicaginis*” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario Zootecnista, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo con que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no ponga una ganancia económica potencial.

Sin de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.

## **DEDICATORIA**

“A Un poder superior, el cual me ha regalado la oportunidad de seguir mi sueño, a mis familiares, en especial a mis padres, que con mucho amor estuvieron apoyándome y a mi hija la cual me inspiró para seguir adelante”

## **AGRADECIMIENTO**

“A mi tutor por ayudarme a la realización de este trabajo y a la Universidad Técnica de Ambato, por darme la oportunidad de adquirir los mejores conocimientos”

## INDICE GENERAL DE CONTENIDO

APROBACIÓN .....	i
DERECHOS DE AUTOR.....	ii
DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
RESUMEN .....	viii
SUMMARY .....	ix
CAPITULO I .....	1
MARCO TEORICO.....	1
1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	1
1.2    Objetivo General: .....	8
1.2.1 Objetivos Específicos: .....	8
CAPITULO II.....	9
METODOLOGÍA: .....	9
2.1 MATERIALES: .....	9
2.2    METODOS: .....	11
2.2.1    Procedimiento: .....	11
CAPITULO III.....	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	19
3.1 Análisis y discusión de resultados .....	19
3.2 Verificación de la hipótesis:.....	24
CAPITULO IV .....	25
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	25
4.1 Conclusiones: .....	25
4.2 Recomendaciones:.....	25
MATERIALES DE REFERENCIA .....	26
Referencias Bibliográficas:.....	26
Anexos:.....	30
Figura 1: Agar papa dextrosa .....	30
Figura 2: Cultivo del hongo .....	30
Figura 3: Siembra del hongo en otros Agares .....	30
Figura 4: Proliferación del hongo.....	31

Figura 5: Aislamiento del hongo .....	31
Figura 6: Esporas.....	31
Figura 7: Colocación del hongo en botellas .....	32
Figura 8: Fumigación del alfalfar .....	32
Figura 9: Corte del alfalfar.....	32
Figura 10: Secado de los forrajes .....	33
Figura 11: Obtención de harina forrajera.....	33
Figura 12: Realización del balanceado .....	33
Figura 12: Vaginas artificiales .....	34
Figura 13: Extracción seminal .....	34
Figura 14: Evaluación seminal.....	34
Figura 15: Motilidad espermática.....	35
Figura 16: Mortalidad.....	35
Figura 17: Mortalidad y morfología tinción (Eosina).....	35
Figura 18: Cola torcida .....	36
Figura 19: Cabeza suelta.....	36
Figura 20: Cola enrollada .....	36
Figura 21: Decapitado .....	36
Figura 22: Cabezas sueltas.....	37
Figura 23: Defecto DAG .....	37
Figura 24: Concentración espermática .....	37

## INDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

Tabla 1. Taxonomía del hongo <i>Pseudopeziza medicaginis</i> .....	2
Tabla 2. Composición nutricional de la dieta experimental a utilizada para la alimentación de carneros.....	12
Gráfico 1: Diagrama de extracciones de semen correspondiente al tratamiento control. ....	14
Gráfico 2: Diagrama de aplicación de GnRH y extracciones de semen correspondiente al tratamiento 1.....	14
Gráfico 3: Diagrama de aplicación de GnRH y extracciones de semen correspondiente al tratamiento 2.....	15
Tabla 3: Efecto del acetato de buserelina sobre la calidad seminal en carneros alimentados con balanceado contaminado con el hongo <i>Pseudopeziza medicaginis</i> .....	19
Tabla 4: Efecto del acetato de buserelina sobre las características reproductivas en carneros alimentados con balanceado contaminado con el hongo <i>Pseudopeziza medicaginis</i> .....	20
Tabla 5: Efecto del acetato de buserelina sobre la capacidad copuladora en carneros alimentados con balanceado contaminado con el hongo <i>Pseudopeziza medicaginis</i> .....	21



## RESUMEN

Este proyecto se realizó en las instalaciones de la Universidad Técnica de Ambato donde se utilizaron nueve (3 por cada tratamiento) carneros adultos mestizos con un peso vivo de 40 kg aproximadamente y de 2 años de edad; los animales pasaron por un proceso de adaptación y entrenamiento con una duración de 20 días por ello, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la aplicación de GnRH sintética (acetato de buserelina) sobre la calidad seminal y características reproductivas de carneros alimentados con alfalfa contaminada al 70% de *Pseudopeziza medicaginis*. El proyecto se llevó a cabo con un diseño completamente al azar. La frecuencia de administración de GnRH y extracción seminal fue (T0: control, T1: Alternado, T2: Continuo) mediante vaginas artificiales para la evaluación de: volumen, mortalidad, concentración, morfología: cabezas de espermatozoides sueltas (MCS), cola pequeña(CP), decapitados(DC), cola torcida(CT), cola doblada (defecto DAG) (CDD), Cola enrollada(CE), movilidad masal, movilidad individual, por otro lado también se evaluó: circunferencia escrotal(CE), volumen testicular(VT) y capacidad copuladora(Ex. Hembra, N° Saltos, Eyaculado, tiempo) de los cuales tuvieron los siguientes resultados: con respecto a la morfología espermática referente a cabezas de espermatozoides sueltas (indicador 4), mostró diferencia significativa ( $P=0,0048$ ) entre tratamientos encontrando menores porcentajes de cabezas de espermatozoides sueltas en los animales que fueron administrados una dosis ( $12\mu\text{g}$ ) de acetato de buserelina media hora antes de la extracción por 7 días seguidos (T2); en cuanto a la movilidad masal e individual se observó diferencias ( $P=<0,0001$ ), siendo la mayor movilidad en el T1 (4) frente a T0 y T2. Se concluye que la administración de acetato de buserelina a una dosis de  $12\mu\text{g}/\text{carnero}$  I.M. actuó eficientemente disminuyendo el índice de cabezas sueltas al administrar 30 minutos antes de la extracción seminal durante 7 días continuos (T2) y como consecuencia en la movilidad tanto masal como individual, lo que es factible en carneros alimentados con alfalfa (*Medicago sativa*) contaminada con el 70% del hongo *Pseudopeziza medicaginis*.

## SUMMARY

This work was carried in Technical University of Ambato where nine (3 for each treatment) adult rams mest with a live weight of approximately 40kg and 2 years old were used; the animals went through a process of adaptation and training with a duration of 20 days for it: This objective of this research was to evaluate the effect of the application of synthetic GnRH (buserelin acetate) on the seminal quality and reproductive characteristics of rams fed with alfalfa contaminated to 70% of *Pseudopeziza medicaginis*. The project was carried out in a completely randomized design. The frequency of GnRH administration and seminal extraction (T0: Control, T1: Alternate, T2: Continuous) by artificial vaginas for the evaluation of: volume, mortality, concentration, morphology: loose head of sperm (MCS), small tail (CP), beheaded (DC), crooked tail (CT), bent tail (DAG defect) (CDD), tail rolled up (CE), mass mobility, individual mobility on the other hand was also evaluated: scrotal circumference (EC), testicular volume (VT) and copulatory capacity (Ex. Female, N° jumps, ejaculate, time) of which the following results were obtained: with respect to sperm morphology referring to a loose head of sperm (indicator 4), it showed a significant difference ( $P=0,0048$ ) between treatments finding lower percentages of loose heads of sperm in animals that were administered a dose ( $12\mu\text{g}$ ) of half-hour buserelin acetate before extraction for 7 days in a row (T2); as soon as regarding mass and individual mobility, differences were observed ( $P=<0,0001$ ), with greater mobility in T1 (4) compared to T0 and T2. It is concluded that the administration of buserelin acetate at a dose of  $12\mu\text{g}$  /ram IM acted efficiently decreasing the index of loose heads when administrated 30 minutes before seminal extraction for 7 continuous days (T2) and as a consequence in both mass and individual mobility. What is feasible in rams fed alfalfa (*Medicago sativa*) contaminated with 70% of the fungus *Pseudopeziza medicaginis*

# CAPITULO I

## MARCO TEORICO

### 1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Muchos de los productores de ovinos se preocupan por su rebaño por lo tanto optan por tener un máximo de dos reproductores sin embargo es fundamental que el semen de estos sea de alta calidad considerando que una de las causas por las cuales esto puede variar es en el área de nutrición animal, pero teniendo en cuenta que la alimentación ovina es a base de pastos en especial alfalfa (*Medicago sativa*). Sin embargo, ciertas patologías pueden causar lesiones. En este sentido, en las leguminosas, ciertos estudios comprueban la contaminación de hongos como la *Pseudopeziza medicaginis* (peca de la alfalfa) provoca una respuesta defensiva de la planta contra el hongo la cual es a base de fitoalexinas de tipo cumestanos estrógenos (fitoestrógenos) (Stwar, 2012).

Los fitoestrógenos pueden clasificarse en 3 grandes grupos: 1) Isoflavonas (soya, lenteja y otras legumbres) y los compuestos activos principales son la genisteína y la daidzeína; 2) Lignanós (linaza y otras semillas aceitosas) y sus compuestos activos principales son la enterolactona y el enterodiól ambos de origen de la flora bacteriana intestinal; y 3) Cumestanos (trébol rojo, girasol, alfalfa, soya) y su compuesto activo principal es el cumestrol, medicagol, sojagol y psoralidina (Pérez-rivero et al. 2007).

En la alfalfa existen 2 grupos de fitoestrógenos: Isoflavonas (genisteína, formononetina, daidzeína y biochanina A) y cumestanos siendo este de 30-100 veces más potente; el cumestrol en condiciones normales en la alfalfa se encuentra entre 1-2mg/kg que en circunstancias de defensa puede subir hasta 100mg/kg (Cortés-Sánchez et al. 2016).

Por ello, el cumestrol aumenta después de la infesta por patógenos foliares; especialmente por dos tipos de hongos: *Pseudopeziza medicaginis* (productor de la viruela de la hoja) y *Uromyces striatus* (productor de la roya); de esta forma, la contaminación con *P. medicaginis* provocó 60 veces más cumestrol que más muestras libres de lesiones, en conclusión, la cantidad de cumestrol está relacionado con el

tamaño y número de lesiones en la planta (**Rodríguez 1993**), por lo tanto es fundamental saber el origen del hongo que es descrito en la tabla 1.

**Tabla 1. Taxonomía del hongo *Pseudopeziza medicaginis***

Pseudopeziza medicaginis Clasificación científica	
Reino	Hongos
Filo	Ascomicota
Clase	Leotiomycetes
Subclase	Leotiomycetidae
Orden	Helotiales
Familia	Dermateaceae
Genero	Pseudopeziza
Especies	<i>P. medicaginis</i>

**(Saccardo, 1887)**

Una sola planta puede contener varias clases de fitoestrógenos. Por ejemplo, el poroto de soya es rico en Isoflavonas, mientras que los brotes de la soya contienen altos niveles de cumestanos. Sin embargo, la formación de fitoestrógenos está dada de la siguiente forma; “Genisteína y daidzeína comúnmente existen glucosiladas. Ellas también son derivadas de precursores, biochanina A y formononetina, cuales son convertidos a genisteína y daidzeína respectivamente, así como secoisolariciresinol y metairensinol son los precursores de cumestrol, enterodiol y enterolactona respectivamente. Después la estructura de cada uno es alterada por glucosidasas intestinales. Daidzeína es parcialmente metabolizada a equol y O-desmetilangiolsina (O-DMA)” (**Cepeda 2008**)

En el tracto gastrointestinal de los animales, luego del consumo de Isoflavonas, Cumestrol y Lignanos, se generan reacciones metabólicas mediadas por enzimas, resultando de esto la formación de fenoles heterocíclicos provocando similitud a la estructura de estrógenos. Mientras tanto, los metabolitos de fitoestrógenos después de la ingesta experimentan absorción vía circulación enterohepática y son excretados en la bilis. Estos son desconjugados por la flora bacteriana intestinal, reabsorbidos, reconjugados por el hígado y excretados por la orina; el metabolismo de fitoestrógenos dietarios es predominantemente determinado por el metabolismo bacteriano gastrointestinal (**Cepeda 2008**)

Los estrógenos que se encuentran en el plasma (post prandial), penetran en sus células blanco en los tejidos llamados “clásicos” que se encuentran en las glándulas mamarias, útero, sistema nervioso central, hígado, placenta, sistema cardiovascular y hueso; las células blanco de estos tejidos están llenos de la isoforma ER (receptores estrogénicos) alfa. Mientras que existen otros tejidos “no clásicos” en los que el receptor ER alfa está en menor cantidad, pero la isoforma ER beta ocupa cantidades significativas; en los que se incluye ovarios, próstata, testículos, glándula pineal, glándula paratiroides, tiroides, pancreáticas y suprarrenales, vesícula biliar, piel, tracto urinario, pulmón, tejido linfático, epitelio intestinal, algunas partes del cerebro como hipotálamo, cerebelo y lóbulo olfatorio (**Pérez-Rivero et al. 2007**)

Por lo tanto, en las células de la línea celular que **American Type Cell Cultural Collection con T47D** los identifica; originado de diferentes tejidos como prostático y mamario, determina que los receptores ER alfa actúan como agonista y ER beta actúan como antagonista provocando cambios en el desarrollo de los tejidos respectivamente. Los ER son receptores nucleares que tienen la capacidad de modular la transcripción por su unión específica a secuencias del genoma, así como a co-represores y co-activadores para regular la reacción del complejo ARN polimerasa. Por ello, los efectos que causan los ER sobre la transcripción se lleva a cabo por varios eventos secuenciales; la unión de los ER con los estrógenos induce cambios en la conformación del receptor, que le permite al mismo tiempo dissociarse de un complejo co-represor y unirse a un complejo co-activador; lo cual le brinda la posibilidad de transcribir los genes que contienen elementos de respuesta a estrógenos. Sin embargo, la ausencia de estrógenos provoca un efecto contrario del complejo co-activador a un complejo co-represor que inhibe la actividad de transcripción. Mientras que en el cerebro el ER beta se encuentra expresada especialmente en el área preóptica en el núcleo ventro-medial del hipotálamo y en el tallo cerebral. Por lo tanto se atribuido principalmente al fitoestrógeno (COU: CUMESTROL) que es capaz de suprimir los picos de LH en ratas y ovejas; por lo tanto, la presencia de receptores ER alfa y ER beta refiere a que los fitoestrógenos actuarían directamente en la neurona receptora de gonadotropina(GnRH) (**Pérez-rivero et al. 2007**). De la misma manera, los ER beta se expresan en diferentes regiones del testículo; como epidídimo, conductos deferentes y próstata. Así mismo se sabe que existen en las células de Sertoli, espermatogonias y espermatozoides. Por lo contrario, en adultos se expresa más los ER alfa en las células

de Leydig. Sin embargo estudios realizados indican que *In vitro*, la GEN (Genisteína) induce la apoptosis en líneas derivadas de las células de Leydig dependientes de la concentración y en ratones según **Atanassova et al., (2000)** menciona que al inyectar 4mg/kg de GEN SC durante 16 días, se inhibe el desarrollo testicular a corto y largo plazo que en su adultez afectará al número de camadas. Mientras tanto, en un estudio realizado en toros, la ingesta de pasturas que contienen COU provocaron metaplasia glandular y epitelial tanto en próstata como en glándulas bulbo- uretrales; así mismo presentaron un gran número de espermatozoides inmaduros y con disminución de movilidad (**Pérez-rivero et al. 2007**).

Por ello, **Novillo-Rueda et al (2017)** realizó un experimento el cual consiste en evaluar la calidad seminal de carneros criollos alimentados con dieta que contenga alfalfa contaminada a 3 niveles de *Pseudopeziza medicaginis* T1:10% T2:30% T3:70%. El cual evaluó los siguientes parámetros: Volumen (VOL) mortalidad (MOR), concentración (CONC), morfología (MRF), movilidad masal (MMSL) e individual (MIDL). VOL y MOR no mostraron diferencias (P=0,4856 y P=0,5952 respectivamente) entre tratamientos. Sin embargo la CONC (P=0,0117) mostró diferencia, en T1 ( $4,63 \text{ Sp} \times 10^9$ ) con respecto a T2 y T3. La MRF mostró diferencias (P=0,0016) entre tratamientos. En MMSL se observó diferencias (P=0,0001) entre tratamientos, con un valor máximo para T1 (4,43). Finalmente, la MIDL en T1 y T2 fue superior (P=0,0007) a T3; En conclusión, la ingesta de *Pseudopeziza medicaginis* al 70% provoca cambios en la morfología espermática y por ello cambios en los índices reproductivos.

El efecto que genera los fitoestrógenos es provocado después del consumo de altas cantidades del forraje contaminado los cuales por su capacidad de unirse a los receptores de estrógenos dentro del organismos provoca cambios reproductivos (**Cortés-Sánchez et al. 2016**).

La GnRH es la hormona liberadora de gonadotropina, la cual actúa en el eje hipotálamo- hipofisario, la cual estimula la producción de LH (hormona luteinizante) y FSH (hormona folículo estimulante), las cuales actúan directamente en la producción de células de Leydig (LH) como productoras especializadas de testosterona y células de sertoli (FSH) en la espermatogénesis (**Valiente 2008**).

En la espermatogénesis se realiza un proceso de división meiótica que está controlado por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal que a partir de cada espermatogonia se producen 4 espermatozoides haploides que permanecen unidos entre sí por puentes citoplasmáticos que a su vez están en comunicación con su célula nutricia o célula de Sertoli; estas últimas a partir de moléculas señaladoras inducen al proceso denominado espermiogénesis o metamorfosis que convierte las espermátides en espermatozoides.

Se reconocen cuatro fases características en esta transformación: la fase de Golgi, la de capuchón, la acrosomal y la de maduración.

En la fase de Golgi, la organela del mismo nombre se acerca al núcleo, desprende vesículas que se sobrepone y poco a poco se unen para convertirse en vesícula acrosomal que se localiza en la parte apical del núcleo. Los centriolos situados en forma de T, muy cercanos al aparato de Golgi, van migrando hacia lo que será la base del núcleo, el centriolo proximal se sitúa en la parte central del núcleo y a partir del centriolo distal crece el axonema conformado por dos microtúbulos centrales y 9 pares de microtúbulos periféricos.

En la fase de capuchón, la vesícula acrosomal se aplana formando una verdadera capucha sobre el núcleo. El núcleo se compacta mucho más al cambiar las histonas por protaminas, de tal forma que no puede haber ni replicación ni transcripción (fase G<sub>0</sub> del ciclo celular). La inactividad transcripcional del núcleo hace que el espermatozoide sea dependiente de modificaciones postranscripcionales como la fosforilación de proteínas necesarias para adaptar su función de acuerdo a las necesidades. Las fosforilaciones ocurren desde las células germinales, casi siempre en los residuos de tirosina.

En la fase acrosomal los espermátides giran en dirección que, a la membrana basal, se depositan gránulos en el acrosoma, el citoplasma se desplaza hacia la base de la cabeza y se localiza bajo la unión núcleo axonema; las mitocondrias se agrupan alrededor de este último en su parte cercana al núcleo, formando la pieza media. En esta fase adquieren los espermatozoides su morfología definitiva.

Fase de maduración, donde se observan las características finales de los espermatozoides forma de la cabeza y características de cada especie (oval y plana), cubierta en dos terceras partes por el acrosoma; y la cola compuesta por la parte media

principal y terminal, en la media se encuentran las mitocondrias en forma de hélice. En esta fase se elimina gran parte del citoplasma por desplazamiento del mismo hacia la porción terminal de la cola organizando la llamada gota citoplasmática. Y esta fase termina con la expulsión de los espermatozoides hacia la luz del conducto que a la final llega a una zona denominada *rete testis* (Olivera Ángel et al. 2006).

Se realizó un estudio en donde se analiza los patrones de testosterona aplicando GnRH en 6 carneros de la raza Romney Marsh, los animales fueron inyectados intramuscularmente con distintas concentraciones de GnRH (acetato de buserelina), se obtuvieron muestras de sangre 20 minutos antes y después de la aplicación de GnRH, se obtuvo resultados en una curva de testosterona al aplicar 4µg de buserelina 2,5 horas después con valores que alcanzaron 14,1ng/ml de testosterona plasmática. También se obtuvo un cambio aplicando dosis alta de 12µg de buserelina obteniendo 23,4ng/ml sin embargo la concentración de testosterona plasmática es dependiente de la dosis (Adnaur et al. 2016).

De la misma forma, según Fila, Carabetta, Gomez, & Ungerfeld, (1985) realizó un estudio el cual se basaba en el contenido de fluido testicular realizando con 14 carneros cruza Corriedale X Milchschaft de un año ( $47,4 \pm 1,6$  kg; media  $\pm$  EE). Siete carneros recibieron 7 µg de un análogo de GnRH (acetato de buserelina) IV cada una hora, empezando a las 8 am, y otros 7 carneros permanecieron como tratamiento control. Una semana más tarde, los animales de los grupos tratados y controles fueron entrecruzados recibiendo el otro tratamiento. Una hora antes de la colocación de GnRH y 0,1,2,4,7 y 10h después de que el tratamiento inicio se realizaron medidas ecográficas. La intensidad de pixeles (mayor cantidad de líquido testicular) cuando se aplicó el tratamiento con acetato de buserelina la diferencia fue significativa desde una hora después de la primera aplicación de GnRH; en conclusión, determinaron que múltiples dosis de GnRH incrementaban el fluido testicular en carneros.

Por otro lado, estudiaron la administración diaria de acetato de buserelina para mejorar la calidad espermática en carneros durante la época no reproductiva y el aumento de las concentraciones plasmáticas de testosterona. El estudio fue realizado con 10 machos en donde 5 recibieron una dosis de buserelina durante 10 días seguidos y 5 fueron utilizados como control. Las concentraciones de testosterona plasmáticas fueron mayores que los animales de control dando su aumento inmediato 10h después



de la administración de la primera dosis de acetato de buserelina. Los resultados fueron los siguientes: la motilidad espermática y el porcentaje de espermatozoides móviles fueron mayores en los tratados ( $3.9 \pm 0.6$  y  $70.1 \pm 7.9\%$ , respectivamente) en los animales de control ( $1.0 \pm 0.6$ ,  $P < 0.01$ ;  $45.0 \pm 7.9\%$ ,  $P < 0.05$  respectivamente) en el día 4 ya hubo cambios significativos en los tratados frente a los de control ( $81.8 \pm 6.2\%$  en comparación con  $63.5 \pm 6.4\%$ , respectivamente,  $P = 0.08$ ).

El tratamiento disminuyó el porcentaje de espermatozoides con defecto en la parte media y con la cola doblada ( $7.0 \pm 1.5\%$  comparado con  $12.0 \pm 1.5\%$ ;  $8.0 \pm 1.7\%$  comparado con  $13.5 \pm 1.7\%$ , machos tratados y de control, respectivamente,  $P = 0.05$  para ambos) y el porcentaje de raíz cuadrada de espermatozoides con cabezas sueltas, pero con estructuras normales tendió a ser menor en machos tratados que en controles ( $1.3 \pm 0.3\%$  comparado con  $0.4 \pm 0.3\%$  respectivamente).  $P = 0.06$ ) por ello; el estudio concluyó que es posible la administración diaria de buserelina para un aumento rápido de testosterona plasmática y su mejoramiento en la calidad espermática (**Giriboni, J., Gökdal, Ö., et al. 2019**).

## **1.2 Objetivo General:**

Evaluar el efecto de la aplicación de GnRH sintética sobre la calidad seminal y características reproductivas de carneros alimentados con alfalfa contaminada con *Pseudopeziza medicaginis*.

### **1.2.1 Objetivos Específicos:**

- Determinar los efectos del acetato de buserelina (12 µg) sobre la calidad seminal en carneros alimentados con alfalfa contaminada con el 70% de *Pseudopeziza medicaginis*.
- Analizar diferentes frecuencias de aplicación (continua y alternada) del acetato de buserelina sobre la calidad seminal en carneros alimentados con alfalfa contaminada con el 70% de *Pseudopeziza medicaginis*.
- Cuantificar los efectos producidos por el consumo de alfalfa contaminada con 70% *Pseudopeziza medicaginis* y la administración de acetato de buserelina sobre las características reproductivas (circunferencia escrotal, volumen testicular, y capacidad copuladora).

## **CAPITULO II**

### **METODOLOGÍA:**

#### **2.1 MATERIALES:**

##### ✓ **Equipos**

- Microscopio Leica DM300
- Porta objetos
- Cubre objetos
- Baño María
- Plato caliente
- Micropipeta (100µl)
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar BIOBASE
- Incubadora red line – by BINDER
- Bomba de fumigar de 25 litros
- Moledora a electricidad
- Cocina eléctrica
- Recipiente térmico
- Picadora
- Mezcladora
- Espermiodensímetro karras

##### ✓ **Materiales**

- Fundas Ziproc
- Cajas Petri
- Jeringas
- Micropuntas
- Mechero
- Agua destilada

- Cuadrado de barrilla 1x1m
- Alfalfa al 70% de severidad de *Pseudopeziza medicaginis*
- Dieta alimenticia
- Corrales
- Comederos
- Bebederos
- 9 Carneros
- 2 ovejas
- Vaginas artificiales
- Jaula de extracción de semen
- Recolectores de semen (microtubos de centrifugación)
- Balanzas de 4kg y 100Kg
- Mesa
- Termómetro de agua
- Taype
- Marcador
- Guantes
- Mascarillas
- Mandil
- Overol
- Botas
- Tijeras
- Cuerdas
- Sacos
- Lentes
- Vaso de precipitación
- Cloruro de sodio (NaCl 0.9%)
- Tubo de recolección de semen

### ✓ **Reactivos**

- Agar papa dextrosa
- Hormona GnRH (Acetato de buserelina) (GESTAR® Over)
- Tinción eosina-nigrosina
- Prostaglandina (F2 $\alpha$ )

## **2.2 METODOS:**

### **2.2.1 Procedimiento:**

#### **2.2.1.1 Proceso de contaminación y secado:**

El experimento conto con varias etapas; la primera es la contaminación intencional de la alfalfa con el hongo; utilizando el método descrito por **Morgan, W. C., & Parbery, D. G. 1977** en el laboratorio de sanidad vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Seguidamente, el Agar papa dextrosa ya cultivado con el hongo *Pseudopeziza medicaginis* y con la ayuda de una aguja se realizó la contaminación en 3 botellas de 250ml de agua destilada, que durante 3 días permanecieron en la incubadora, posteriormente con la ayuda de una bomba de mochila se fumigó un alfalar, 7 días después se cortó y se colocó en el establo oculto al sol para su secado con una duración de 6 semanas. Por otro lado, los demás forrajes; Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y Raygrass (*Lolium perenne*) fueron secados en un invernadero con la exposición al sol aislado de la alfalfa proceso que duro 5 semanas.

#### **2.2.1.2 Elaboración del balanceado**

Posteriormente los forrajes fueron picados (picadora) y molidos (molino). Obteniendo harina de alfalfa al 70% de contaminación con *Pseudopeziza medicaginis*, incluyendo la harina forrajera de los demás pastos.

El siguiente paso fue elaborar un balanceado con una dieta previamente establecida por **Novillo-Rueda et al, 2017** (tabla 2) y basada en los requerimientos nutricionales recomendados por **Nutrients requirements of sheep, 1997**. Que aportan nutricionalmente con proteína 131g/kg MS<sup>-1</sup>, energía 2439.2Kcal /kg MS<sup>-1</sup>, calcio 2g/kg MS<sup>-1</sup> y fósforo 1,2g/kg MS<sup>-1</sup>).

Tabla 2. Composición nutricional de la dieta experimental a utilizada para la alimentación de carneros.

<b>Materia prima</b>	<b>Cantidad (%)</b>	<b>Proteína cruda (g/kg MS<sup>-1</sup>)</b>	<b>Energía (Kcal /kg MS<sup>-1</sup>)</b>	<b>M Calcio (g/kg MS<sup>-1</sup>)</b>	<b>Fosforo (g/kg MS<sup>-1</sup>)</b>
Alfalfa	44	80	893.9	0.65	0.28
Kikuyo	9	4.6	162.2	0.0126	0.040
Raygrass	4	2.2	76.2	0.016	0.0064
Maíz	31	24.8	1009.7	0.13	0.062
Polvillo	5	6	136.4	0.003	0.009
Afrecho de trigo	4	4.8	131.1	0.008	0.026
Melaza	1	0.3	29.75	0.11	0.011
Carbonato de calcio	1	0	0	0.38	0
Fosfato dicálcico	1	0	0	0	0.18
<b>Total:</b>	<b>100%</b>	<b>131</b>	<b>2439.2</b>	<b>2</b>	<b>1.2</b>

(Novillo-Rueda et al 2017)

Todos los animales utilizados en los 3 tratamientos fueron alimentados con la misma dieta.

### 2.2.1.3 Obtención y adaptación de los carneros.

La siguiente etapa del proyecto fue la compra y adaptación de los animales, para lo cual se adquirieron 9 carneros criollos de 2 años de edad

aproximadamente y que se estimó basado en su cronología dentaria y un peso promedio de 40kg en las ferias de: Riobamba y Cajabamba (de origen comunitario) que enseguida fueron trasladados a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato. Al llegar los animales fueron colocados en corrales individuales, los cuales fueron desparasitados (Febendazol: panacur®10% a una dosis de 6mg/kg/carnero) y alimentados con forraje verde incluyendo sal mineralizada (Pecutrin ® 15g/carnero) con un periodo de adaptación de 15 días.

#### **2.2.1.4 Entrenamiento de los carneros.**

Se realizó la estimulación de pene y testículos para acostumbrarles a la extracción seminal (**Flores 2003**).

Seguidamente se realizó un protocolo OVSYNCH (**Vicente Bermejo 2014**) en 2 ovejas hembras propias de la facultad, las cuales fueron colocadas en un jaula fija al suelo para que ayuden durante la estimulación de los machos.

Cada macho fue expuesto a la hembra para su entrenamiento con una duración de 2 semanas.

#### **2.2.1.5 Extracción de semen e inicio del experimento.**

Para la extracción del semen se utilizó una vagina artificial la cual fue elaborada con tubo PVC de 10cm de largo por 5,5cm de ancho, con una válvula y en su interior una manga de goma (tubo de bicicleta) y adicionalmente pedazos de tubo en el interior de la manga para una buena adaptación del pene.

Por medio de la válvula se colocó agua a 40°C (3/4) y aire (1/4) para generar presión y calor que al final del tubo se colocó una copa con un microtubo de recolección de semen graduado (**Novillo-Rueda et al 2017**).

El experimento contó con 3 tratamientos que se describen a continuación;

En el tratamiento control (T0) se utilizó tres carneros adultos con un peso vivo de 40 kg aproximadamente y de 2 años de edad. Se realizó 6 extracciones de semen durante 2 semanas consecutivas; los días 1,4,7,8,11 y 14 del periodo experimental, como se muestra en el grafico 1.

SEMANA 1			SEMANA 2		
Día 1	Día 4	Día 7	Día 8	Día 11	Día 14
extracción	extracción	extracción	extracción	extracción	extracción

**Fuente:** El autor

**Grafico 1: Diagrama de extracciones de semen correspondiente al tratamiento control.**

En el tratamiento 1 (T1) se utilizaron tres carneros adultos con un peso vivo de 40 kg aproximadamente y de 2 años de edad. Este tratamiento tuvo una duración de 4 semanas. Durante la primera semana todos los animales recibieron GnRH (acetato de busarelina) a dosis de 12 µg; 2,8ml/cordero.

En la segunda semana se realizó tres extracciones de semen los días 8, 11 y 14. Durante la tercera semana todos los animales recibieron GnRH (acetato de busarelina) a dosis de 12 µg; 2,8ml/cordero. Finalmente, en la cuarta semana se realizó tres extracciones de semen los días 22, 25 y 28 del periodo experimental como se muestra en el grafico 2.

SEMANA 1							SEMANA 2		
Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 11	Día 14
GnRH	GnRH	GnRH	GnRH	GnRH	GnRH	GnRH	extracción	extracción	extracción
SEMANA 3							SEMANA 4		
Día 15	Día 16	Día 17	Día 18	Día 19	Día 20	Día 21	Día 22	Día 25	Día 28
GnRH	GnRH	GnRH	GnRH	GnRH	GnRH	GnRH	extracción	extracción	extracción

**Fuente:** El autor

**Grafico 2: Diagrama de aplicación de GnRH y extracciones de semen correspondiente al tratamiento 1.**



En el tratamiento 2 (T2) se utilizaron tres carneros adultos con un peso vivo de 40 kg aproximadamente y de 2 años de edad y tendrá una duración de 2 semanas. Durante la primera semana todos los animales recibieron GnRH (acetato de buserelina) a dosis de 12 µg; 2,8ml/cordero; mientras en la misma semana se realizó tres extracciones de semen los días 1, 4 y 7.

En la segunda semana todos los animales recibieron GnRH (acetato de buserelina) a dosis de 12µg; 2,8ml/cordero y de igual forma en la misma semana se realizó tres extracciones de semen los días 8, 11 y 14 como se explica en el grafico 3.

SEMANA 1						
Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
GnRH			GnRH +			GnRH +
+Extracción	GnRH	GnRH	Extracción	GnRH	GnRH	Extracción
SEMANA 2						
Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14
GnRH			GnRH			GnRH
+Extracción	GnRH	GnRH	+Extracción	GnRH	GnRH	+Extracción

**Fuente: El autor**

**Grafico 3: Diagrama de aplicación de GnRH y extracciones de semen correspondiente al tratamiento 2.**

### 2.2.1.6 Evaluación seminal y características reproductivo

Las muestras seminales obtenidas post extracción fueron sometidas a análisis de laboratorio, basado en la metodología según **Novillo-Rueda et al, (2017)** detallada a continuación:

- Volumen: Para medir el volumen de eyaculado se utilizó un recolector graduado en ml y acoplado directamente en la vagina artificial (volumen normal de eyaculado de un carnero joven es de 0.5 a 0.7ml y en adultos es de 0.5 a 2ml que por lo general lo encontramos entre 0.8 a 1.2ml)

- **Concentración:** Se evaluó utilizando un Espermiómetro de karras y con la ayuda de una micro pipeta (20-100µl) se extrae 100 µl de solución salina (NaCl 0.9%) y se coloca 100 µl de semen; con una relación de 1-100 (01:10) el cual se mezcló y se observó en un fondo blanco el cual sencillamente se categorizó hasta el número visible. (lo encontramos entre 2000 a 6000 x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml) (**Tapia Jácome 2014**)
- **Motilidad:** Para determinar la movilidad se homogenizó la muestra en un tubo recolector(micro-túbulos), se extrajo con una jeringa una gota de semen y se colocó en un portaobjetos el cual se encontraba en un plato caliente a una temperatura de 35°C que posteriormente se observó en un microscopio a un aumento de 10X a 40X. Se pudo tener una idea en cuestión de motilidad por la velocidad con que se hacen y deshacen las ondas. Sin embargo, nos guiamos en una escala subjetiva para motilidad masal entre 0 muertos (sin movimientos), 1 muy pobre (muy pocos movimientos), 2 pobre (No aparecen ondas, pero se ven movimientos espermáticos) , 3 regular (Ondas de movimiento lento),4 buena (Ondas y remolinos vigorosos, pero no tan rápida) y 5 muy buena (Ondas densas de movimiento muy rápidas) (**Moreno et al. 2012**) y en cuanto a motilidad individual: 1 muertos(sin movimiento), 2 mala ( menos de 40% de células móviles), 3 regular (40-59% de células móviles), 4 buena (60-79% de células móviles), 5 muy buena (80-100% de células móviles) (**Tribulo et al.2014**).
- **Mortalidad:** Para obtener resultados de esta prueba se realizó mediante la utilización de las tinciones eosina-nigrosina las cuales son homogenizadas junto a una gota de semen en un portaobjeto en cual se encontraba en plato caliente a una temperatura de 35°C, posteriormente se observó en el microscopio a 40X y se contabilizó lo espermatozoides en un cuadro dando el 100% y se comparó con los espermatozoides muertos los cuales están teñidos en su acrosoma ( lo cual debe ser imposible en vivos) que al final obtendremos un porcentaje (se

encuentra entre 20 a 25% si este porcentaje es mayor, el semen se clasifica como no apto para la reproducción).

- **Morfología:** Para determinar la morfología espermática se realizó tomando una gota de semen y colocándolo en un portaobjetos este previamente colocado en un plato caliente a una temperatura de 35%, en seguida se realizó una tinción con eosina-nigrosina obteniendo un frotis el cual es colocado en un microscopio y observado en aumento 40X, este es contabilizado según los parámetros en cabeza: cabeza grande(1), cabeza pequeña(2), doble cabeza(3), cabeza suelta(4) y cola: cola pequeña(5), decapitados(6), doble cola(7), cola torcida(8), cola doblada(9), cola enroscada(10); para finalmente obtener un porcentaje (si existe un 15% de anormalidades el semen no es apto para la reproducción)

De la misma forma se evaluaron las características reproductivas que a continuación se detallan:

- **Circunferencia escrotal:** está relacionada con la cantidad de tejido testicular; a mayor circunferencia mayor espermatozoides y a menor circunferencia escrotal menor espermatozoides y la medición se realizó tomando una cinta métrica y colocándolo en la parte media de los testículos (ovinos criollos; diámetro testicular medición externa:  $22.3 \pm 4.61$  cm) (**Moreno et al. 2012**).
- **Volumen testicular:** La producción espermática está relacionada con el volumen testicular, el carnero produce 20 millones de espermatozoides por gramo de testículo por este motivo el volumen testicular es importante para conocer la capacidad de fecundación del carnero (**Folch 2000**);

Se realizó mediante fórmula matemática utilizando medidas de 2 ovoides y se realizó de la siguiente manera:

$$CE = \frac{2\pi r}{2} + \frac{2\pi r}{2} + \frac{8r}{2}$$

$$r(\text{menor}) = \frac{CE * 2}{4\pi + 8}$$

$$r(\text{mayor}) = (l1 + l2)/2$$

$VT = (r.\text{menor})(r.\text{menor})(r.\text{mayor})\left(\frac{4}{3}\right)(\pi)$ , en donde:

*CE: Circunferencia escrotal*

*L: Longitud testicular*

*r: Radio*

*VT: Volumen testicular*

(En carneros Pelibuey entre 12 y 14 meses de edad; El volumen testicular esta entre 484-493ml)(**Perón 2010**).

- Capacidad copuladora: Se realizó mediante etapas: 1) Exposición a la hembra el cual se clasificó en: SI, MEDIO, POCO, NO; y este es evaluado mediante el comportamiento descrito por **Orihuela (2014)** 2) Número de saltos. 3) Eyaculado que se clasificó en SI, NO. 4) Tiempo. El cual es mediante la utilización de un macho listo para la extracción, este es medido al ingresar a la jaula junto con la hembra y es evaluado hasta la eyaculación.

## CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Análisis y discusión de resultados

##### 3.1.1 Efecto del acetato de buserelina y la administración de alimento contaminado sobre la calidad seminal:

El volumen, concentración y la mortalidad no mostraron diferencia ( $P=0,3941$ ,  $P=0,5775$  y  $P=0,1378$  respectivamente). Con respecto a la morfología espermática referente a cabeza suelta (indicador 4), mostró diferencia significativa ( $P=0,0048$ ) entre tratamientos encontrando menores porcentajes de cabezas sueltas de espermatozoides en los animales que fueron administrados una dosis ( $12\mu\text{g}$ ) de acetato de buserelina media hora antes de la extracción por 7 días seguidos (T2). En cuanto en la movilidad masal e individual se observó diferencias ( $P=<0,0001$ ), siendo la mayor movilidad en el T1 (4) frente a T0 y T2 (Tabla 3).

Tabla 3: Efecto del acetato de buserelina sobre la calidad seminal en carneros alimentados con balanceado contaminado con el hongo *Pseudopeziza medicaginis*

INDICADORES	T0	T1	T2	SD	P-Valor
Volumen(ml)	1,05	0,96	0,83	0,160	0,3941
Mortalidad (%)	52,82	46,06	48,64	6,473	0,5775
Concentración(Sp x $10^6/\text{ml}$ )	2898,22	3511,56	2619,33	449,610	0,1378
MCS (4) (%)	15,83 <sup>a</sup>	8,04 <sup>ab</sup>	4,23 <sup>b</sup>	3,433	0,0048
CP (5) (%)	0,07	0,00	0,00	0,054	0,3750
DC (6) (%)	3,25	3,43	0,62	1,281	0,0575
CT (8) (%)	14,11	13,45	17,55	2,667	0,2647
CDD (9) (%)	9,65	10,57	7,20	2,035	0,2420
CE (10) (%)	7,17	3,62	4,98	2,059	0,2293
Movilidad masal*	2 <sup>b</sup>	4 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	0,435	<0,0001
Movilidad individual**	2 <sup>b</sup>	4 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	0,439	<0,0001

MCS: Morfología Cabezas sueltas de espermatozoides, CP: Cola pequeña, DC: Decapitados, CT: Cola Torcida, CDD: Cola doblada (defecto DAG), CE: Cola Enrollada.  
 \*0 muertos (sin movimientos), 1 muy pobre (muy pocos movimientos), 2 pobre (No aparecen ondas, pero se ven movimientos espermáticos), 3 regular (Ondas de movimiento lento), 4 buena (Ondas y remolinos vigorosos, pero no tan rápida), 5 muy buena (Ondas densas de movimiento muy rápidas)  
 \*\* 1 muertos(sin movimiento), 2 mala ( menos de 40% de células móviles), 3 regular (40-59% de células móviles), 4 buena (60-79% de células móviles), 5 muy buena (80-100% de células móviles)  
 SD: Desviación estándar. ab: medias con letras distintas entre columnas difieren significativamente ( $P < 0,05$ ), T0: Tratamiento control, T1: protocolo alternado T2: protocolo continuo.

### 3.1.2 Efecto del acetato de buserelina y la administración de alimento contaminado sobre las características reproductivas:

En cuanto a circunferencia escrotal (inicial y final) y volumen testicular (inicial y final) no hubo diferencia ( $P=0,0989$ ,  $P=0,5819$  vs  $P=0,0784$ ,  $P=0,3583$  respectivamente) (tabla 4).

Tabla 4: Efecto del acetato de buserelina sobre el características reproductivas en carneros alimentados con balanceado contaminado con el hongo *Pseudopeziza medicaginis*

	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>SD</b>	<b>P-Valor</b>
<b>Circunferencia escrotal(cm) inicial</b>	27,83	25,83	31,33	2,10819	0,0989
<b>Circunferencia escrotal(cm) final</b>	27,50	29,33	30,47	2,74820	0,5819
<b>Volumen testicular(ml) inicial</b>	245,17	200,31	341,92	51,10866	0,0784
<b>Volumen testicular(ml) final</b>	240,51	282,86	328,97	56,56335	0,3583

SD: Desviación estándar. ab: medias con letras distintas entre columnas difieren significativamente ( $P < 0,05$ ), T0: Tratamiento control, T1: protocolo alternado T2: protocolo continuo.

Referente a la capacidad copuladora hubieron diferencias en cuanto a exposición a la hembra lo cual el T2 tuvo mayor número de acertados (16) con respecto a los demás

tratamientos (T0=14, T1=15), referente a los animales con capacidad (medio) solo el T2 tuvo resultados (1) siendo los demás tratamientos (0), por otro lado, los animales con capacidad copuladora (poco) hubo diferencias entre los 3 tratamientos siendo el T0 con mayor número (4) con respecto al T1 y T2 (3 y 1 respectivamente).

En el número de montas hubo diferencias donde los animales del (T2=4.72) tuvieron un promedio más alto en montas previo a la eyaculación, con respecto a los demás tratamientos (T0=4.16 y T1=3.11). En el eyaculado no hubo diferencias debido a que los animales de los 3 tratamientos eyacularon. Sin embargo, en cuanto al tiempo hubo diferencias entre los 3 tratamientos dando como resultado el T1 el cual tuvo un promedio de tiempo de (8.6 minutos) con respecto a los demás tratamientos (T0=2.8, T2=5.7) (tabla 5).

Tabla 5: Efecto del acetato de buserelina sobre el capacidad copuladora en carneros alimentados con balanceado contaminado con el hongo *Pseudopeziza medicaginis*

EXPOSICION HEMBRA	N° DE				EYACULADO	TIEMPO
	SI	MEDIO	POCO	NO		
<b>T0</b>	14	0	4	0	T0	2,8
<b>T1</b>	15	0	3	0	T1	8,6
<b>T2</b>	16	1	1	0	T2	5,7

*TRATA: Tratamientos SI, MEDIO, POCO, NO: En base a las medidas explicadas en la metodología.*  
*PROM: Promedio*  
*MIN: minutos*

El no mostrar diferencia entre volumen y concentración entre tratamientos se debe seguramente a que el consumo de *Pseudopeziza medicaginis* y la administración correspondiente de GnRH no afectó directamente a los receptores RE beta de las vesículas seminales y los conductos eyaculadores (Novillo-Rueda 2017), por otro lado Pérez-rivero et al. (2007) investigó en toros, la ingesta de pasturas que contienen COU(cumestrol) el cual provocó metaplasia glandular y epitelial tanto en próstata como en glándulas bulbo- uretrales, lo que en esta investigación no vario.

En cuanto a mortalidad no hubieron diferencias entre tratamientos, pero el porcentaje fue superior a lo recomendado por Salomón S., (2000) (>25%). Las altas mortalidades encontradas en el presente trabajo (entre 46,06% y 52,82 %) puede estar relacionado

a que en algunas muestras hubo mayor exposición a la luz solar y a los cambios de temperatura (**Mejía 2014**).

Con respecto a morfología hubo diferencia significativa en el indicador 4 referente a cabezas sueltas para el T2 que recibieron GnRH en forma continua y mostraron menor porcentaje para esta variable (4,23%) con relación a los demás tratamientos. Este hallazgo va acorde con lo mencionado por **Giriboni, J., Gökdal, Ö., et al. (2019)** que refiere que la administración de acetato de busserelina continuamente disminuyó la cantidad de cabezas sueltas.

Por otra parte, según **González Jiménez et al. (2016)** menciona que el consumo de fitoestrógenos (cumestrol) altera la morfología espermática al igual que recaló **Novillo-Rueda (2017)** que al consumir alfalfa contaminada al 70% del hongo *P. medicaginis* provocó cambios en la morfología espermáticas en cola específicamente.

Los autores **Valiente et al., (2008)** en su fisiología describen que la GnRH actúa sobre las células de sertoli y estas provocan dos hormonas (activina e inhibina) por ello seguramente los fitoestrógenos al alterar las funciones de las células de sertoli van a provocar disminución de Activina la cual por retroalimentación positiva manda señales al hipotálamo para la eliminación de GnRH.

En esta investigación el consumo de dietas contaminadas por el mismo hongo provocó un 15,83% de alteraciones en cabezas sueltas. Por lo tanto, esta investigación ha sido importante ya que se probó el acetato de busserelina en animales que consumieron alfalfa contaminada y disminuyó las anomalías morfológicas.

Las alteraciones morfológicas vistas anteriormente, contienen fundamentación fisiopatológica; **Pérez-rivero et al. (2007)** menciona que la presencia de ER alfa y ER beta se encuentran en la neurona receptora de gonadotropina(GnRH) lo que provoca un acoplamiento del estrógeno al receptor, cambiando su transcripción genómica y disminuyendo la cantidad de hormona liberada por el hipotálamo, que de igual manera esto sucede en tejidos “no clásicos” como el testículo y epidídimo.

**Olivera Ángel et al. (2006)** describe la espermiogenesis que es utilizado para la verificación de las alteraciones provocadas en esta investigación las cuales suceden específicamente en la fase acrosomal entre espermátides a espermatozoides y tienen un efecto sobre la formación del flagelo. En este sentido **Valiente et al., (2008)**



describe la función fisiológica de la hormona la cual provee de GnRH tanto al hipotálamo con a las células de sertoli, provocando la efectiva disminución especialmente en cabezas de espermatozoides sueltas.

Además, por esta misma razón se observó efectos sobre la movilidad masal e individual que mostró diferencia significativa debido a las anomalías morfológicas del espermatozoide por ello se verán interrumpidos siendo incapaces de moverse entre sí. Resultados que están en concordancia con **Novillo-Rueda (2017)**.

Además **Adnaur et al. (2016)** menciona que al administrar una dosis de 12µg de acetato de buserelina provocó un incremento de 23,4ng/ml de concentración de testosterona plasmática por ellos en esta investigación seguramente la acumulación de acetato de buserelina por 7 días seguidos sin extracción(T1), ayudó eficientemente la movilidad tanto masal como individual(indicador 4).

En la circunferencia escrotal y el volumen testicular, no hubo diferencia entre tratamientos, esto está relacionado a la cantidad de espermatozoides que de igual forma no varió. En este sentido, **Moreno et al. (2012)** menciona que la cantidad de espermatozoides aumenta si la circunferencia escrotal es mayor y viceversa. Por otro lado, **Atanassova et al., (2000)** observó que al inyectar (4mg/kg) en ratones de GEN (Genisteina)(fitoestrógeno) produjo un efecto en el desarrollo testicular. Sin embargo, en esta investigación el promedio de volumen testicular es bajo al referencial que en carneros de la raza Pelibuey que está entre (484-493ml)(**Perón 2010**) sumado también a que los animales fueron criollos.

El motivo de evaluar la circunferencia escrotal y el volumen testicular también está relacionado al incremento del líquido testicular ya que **Fila, Carabetta, Gomez, & Ungerfeld, (1985)** obtuvo resultados al administrar dosis (7 µg) continuas de acetato de buserelina .Sin embargo, en esta investigación no hubo diferencias en cuanto al líquido testicular.

Y finalmente la capacidad copuladora fue evaluado mediante el comportamiento descrito según **Orihuela (2014)** que aclara en su artículo una serie de movimientos que hace el macho copulador ante la hembra, un numero de montas y un tiempo previo a la eyaculación, sin embargo este proceso no se encuentra categorizado por lo tanto esta investigación tomo datos para realizar un método. Por ello **Adnaur et al. (2016)**

menciona que al administrar una dosis de 12 $\mu$ g, provocó concentraciones de testosterona elevadas, en esta investigación sería esta la causa por la cual los animales tuvieron una excelente capacidad copuladora.

En cuanto a la exposición de la hembra aquellos machos identificaban a la hembra y acorde con el entrenamiento se realizaba el método, sin embargo, a la mitad de la investigación estos bajaron su rendimiento que posiblemente se debería al uso de la misma hembra. Es importante mencionar que al reemplazarla se obtuvo mejores resultados.

### **3.2 Verificación de la hipótesis:**

Según los resultados obtenidos en esta investigación se acepta la hipótesis alternativa ya que el acetato de busrelina actuó eficientemente al provocar menor índice de cabezas de espermatozoides sueltas y por ello un efecto positivo sobre la motilidad en carneros alimentados con alfalfa (*Medicago sativa*) contaminada con el 70% del hongo *Pseudopeziza medicaginis*.

## CAPITULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1 Conclusiones:

Se concluye que la administración de acetato de buserelina a una dosis de 12µg/carnero actuó eficientemente disminuyendo el índice de cabezas de espermatozoides sueltas al administrar 30 minutos antes de la extracción seminal durante 7 días continuos (T2) y como consecuencia en la movilidad tanto masal como individual. Lo que es una alternativa para carneros que se alimentan con alfalfa (*Medicago sativa*) contaminada con el 70% del hongo *Pseudopeziza medicaginis*.

Además, en cuanto a las características reproductivas no se generó ningún efecto al administrar acetato de buserelina en carneros alimentados con alfalfa (*Medicago sativa*) contaminada.

#### 4.2 Recomendaciones:

Se recomienda la administración de acetato de buserelina a dosis de 12µg/carnero 30 minutos antes de la extracción seminal debido a que mejora la calidad seminal en carneros alimentados con alfalfa (*Medicago sativa*) contaminada con el 70% del hongo *Pseudopeziza medicaginis*.

## MATERIALES DE REFERENCIA

### Referencias Bibliográficas:

- Atanassova, N., C. McKinnell, K. Turner, M. Walker, S. Fisher, M. Morley, et al. 2000. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology* 141:3898-3907.
- Adnaur, M; Santiani, A; Sepúlveda, N. 2016. Concentraciones plasmáticas de testosterona máxima en carneros como respuesta a la aplicación de GnRH. *International Journal of Morphology* .
- Cepeda, A. 2008. Universidad de Chile. Disociación de respuestas estrogénicas en presencia de un extracto alcohólico de plantas chilenas, evaluadas en útero de ratas, Universidad de Chile 0(97-98). DOI: <https://doi.org/10.5354/0717-8883.1955.11040>.
- Cortés-Sánchez, ADJ; León-Sánchez, JR; Jiménez-González, FJ; Díaz-Ramírez, M; Villanueva-Carvajal, A. 2016. Alimentos funcionales, alfalfa y fitoestrógenos (en línea). *Revista Mutis* 6(1):28. DOI: <https://doi.org/10.21789/22561498.1110>.
- Fila, D; Carabetta, S; Gomez, S; Ungerfeld, R. 1985. El contenido de fluido testicular en carneros aumenta tras la administración de GnRH. :1984.
- Flores Virginio, Vásquez R. , Orihuela Agustín, 2003. Entrenamiento de carneros para recolección de semen mediante vagina artificial, utilizando como estímulo objetos inanimados. *Veterinaria México*. 36, 105-111
- Folch, J. 2000. Manejo del morueco. *Producción Ovina y Caprina* :61-64.
- Giriboni, J., Gökdal, Ö., Eren, V., Yaralı, E., Santiago-Moreno, J., & Ungerfeld, R. 2019. Daily administration of a GnRH analogue enhances sperm quality in bucks during the non-breeding season. *Animal reproduction science*, 200, 43-50.

- González Jiménez, E; Cañadas de la Fuente, GA; Fernández Castillo, R; Álvarez Ferre, J; González Antón, C. 2016. Fitoesgrógenos y sus efectos sobre la Osteoporosis en la Mujer Posmenopáusica (en línea). *Revista Clínica de Medicina de Familia* 3(3):201-205. DOI: <https://doi.org/10.4321/S1699-695X2010000300008>.
- Mejía, JE. 2014. Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electroeyaculador en el ganado criollo. :1-135.
- Moreno, P; Veterinario, M; Universitaria, F; De Castellanos, J; Mendoza, G; Médico, DF; Zootecnista, V; González, P&. 2012. Correlación Entre Diámetro Testicular Y Calidad Espermática En Ovinos Criollos Del Municipio De Soracá, Boyacá. *Correlation Between Diameter and Testicular Sperm Quality in Sheep'S Creole, Municipality of Soracá Boyacá. Conexión Agropecuaria JDC* 2(2):45-55.
- Morgan, W. C., & Parbery, D. G. 1977. Ascospore liberation, germination and attachment to host surface by *Pseudopeziza medicaginis*. *Australian Journal of Agricultural Research*, 28(5), 777-784.
- McNeill, D. M., Slepatis, R., Ehrhardt, R. A., Smith, D. M., & Bell, A. W. (1997). Protein requirements of sheep in late pregnancy: partitioning of nitrogen between gravid uterus and maternal tissues. *Journal of Animal Science*, 75(3), 809-816.
- Novillo-Rueda et al. 2017. Calidad seminal de carneros alimentados con dietas que contienen alfalfa ( medicago sativa ) contaminada con pseudopeziza medicaginis *Seminal quality of rams feed with diets containing contaminated alfalfa ( medicago sativa ) with pseudopeziza medicaginis.* 2(1):14-19.
- Olivera Ángel, M; Ruíz, T; Tarazona Morales, A; Giraldo Echeverri, C. 2006. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 19(4):426-436.
- Orihuela, TA. 2014. La conducta sexual del carnero. *Revisión Ram's sexual behavior. Review.* *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias* 5(1):49-89.

- Pérez-rivero, J; Aguilar-setién, Á; Martínez-maya, J. 2007. diferentes órganos y sistemas de animales domésticos Phytoestrogens consumption and their effects in different organs and systems of domestic animals. 67(3):325-331.
- Perón, N. 2010. a Review on the Reproduction Characteristics of Pelibuey Sheep in. 4(1):1-22.
- Rodriguez, M. 1993. Efecto del pastoreo de alfalfa tierra de campos en secano sobre aspectos fisiologicos y anatomicos del aparato reproductor de ovejas manchegas, Universidad complitense de Madrid. Efecto del pastoreo de alfalfa tierra de campos en secano sobre aspectos fisiologicos y anatomicos del aparato reproductor de ovejas manchegas, Universidad complitense de Madrid, Facultad de Veterinaria .
- Saccardo, P.A. 1887: Funghi delle Ardenne contenuti nelle Cryptogamae Arduennae della signora M.A. Libert. Malpighia 1: 454-459.
- Salomon S., 2000. Inseminación artificial en ovejas y cabras. Valoración seminal. Zaragoza- España. ISBN 84-200-0675-0
- Stwar, 2012. ANCO. <http://www.geocities.ws/ancoec/ovejeria.html>
- Tapia Jácome, LE. 2014. Universidad técnica de cotopaxi. Valoración seminal en ovinos de raza corriedale y mestizos en la parroquia Cochapamba del cantón Saquisilí (Bachelor's thesis, Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi; Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales .
- Tribulo, Humberto Elias et al.,2014: Evaluacion de Toros y Calidad seminal.Instituto de reproduccion animal Córdoba (IRAC).Córdoba,Argentina.ISBN-10:987-22214-9-9
- Valiente, C. 2008. uso de análogos de GnRH en el control de la reproducción indeseada canina GnRH analogs in the control of the undesirable canine reproduction. ciencias veterinarias 28(2):45-51.
- Vicente Bermejo, J. 2014. Universidad De Córdoba &quot;mejora de la eficiencia reproductiva del ganado vacuno lechero a través del manejo&quot; (en

línea). :1-32. disponible en  
[http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/02\\_12\\_30\\_david\\_casanova.pdf](http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/02_12_30_david_casanova.pdf).

**Anexos:**



**Figura 1: Agar papa dextrosa**



**Figura 2: Cultivo del hongo**



**Figura 3: Siembra del hongo en otros Agares**

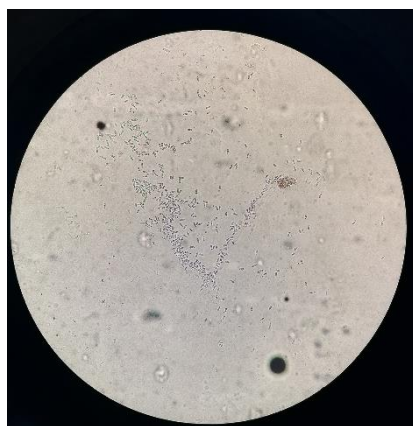




**Figura 4: Proliferación del hongo**



**Figura 5: Aislamiento del hongo**



**Figura 6: Esporas**



**Figura 7: Colocación del hongo en botellas**



**Figura 8: Fumigación del alfalfar**



**Figura 9: Corte del alfalfar**



**Figura 10: Secado de los forrajes**



**Figura 11: Obtención de harina forrajera**



**Figura 12: Realización del balanceado**



**Figura 12: Vaginas artificiales**



**Figura 13: Extracción seminal**

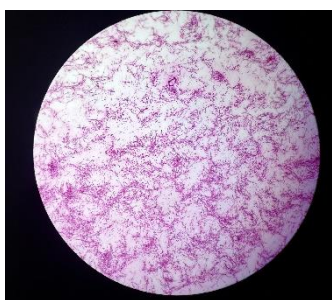


**Figura 14: Evaluación seminal**





**Figura 15: Motilidad espermática**



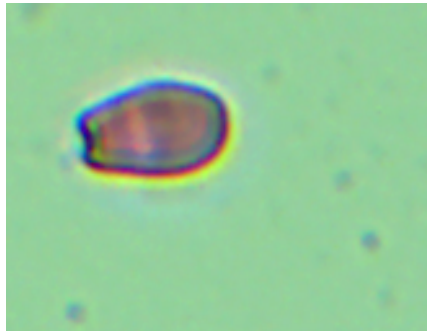
**Figura 16: Mortalidad**



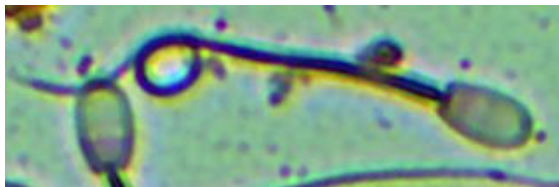
**Figura 17: Mortalidad y morfología tinción (Eosina)**



**Figura 18: Cola torcida**



**Figura 19: Cabeza suelta**



**Figura 20: Cola enrollada**



**Figura 21: Decapitado**



**Figura 22: Cabezas sueltas**



**Figura 23: Defecto DAG**



**Figura 24: Concentración espermática**